第 29 卷 第 2 期 昆 虫 学 报 Vol. 29, No. 2
1986 年 5 月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA May, 1986

蜜蜂间接飞翔肌粗肌丝的微丝结构

范世藩 陈明
(中国科学院上海生理研究所)

摘要 用能溶解肌球蛋白但不溶解副肌球蛋白的溶液 (300 m*M* KCl, pH6.0) 处理分离的蜜蜂间接飞翔肌粗肌丝,经数分钟后可以看到粗肌丝端头散开成为多根微丝,微丝数最多为 7 根。延长处理时间,可以见到粗肌丝中央部分只剩下直径约为 5 nm 的微丝。实验结果支持我们以前提出的蜜蜂间接飞翔肌粗肌丝的结构模式,并指示贯穿肌小节、两端都和 Z 线相连的内芯至少部分由副肌球蛋白组成。只存在于A带的,由 6 根微丝形成的外套是由肌球蛋白分子组成。

关键词 蜜蜂 间接飞翔肌 粗肌丝 微丝 肌球蛋白 副肌球蛋白

自从 A. F. Huxley 和 H. E. Huxley 提出脊椎动物骨骼肌肌原纤维主要由直径不同的粗、细肌丝组成后,目前一般都接受。骨骼肌的粗肌丝几乎全部由肌球蛋白构成,肌丝的长度是恒定的,不因肌小节长度的改变而改变。骨骼肌的收缩是粗、细肌丝相互作用,它们的重叠部分的长度改变的结果。这种模式对于无脊椎动物横纹肌是否完全适用,还存在不少疑点。过去我们从蜜蜂间接飞翔肌得到的结果,显示其粗肌丝的一些表现与脊椎动物骨骼肌的粗肌丝有所不同 (范世藩、洪明霞等, 1966): (1) 间接飞翔肌在位粗肌丝的直径随着肌小节长度的改变而改变; (2) 分离出来的粗肌丝的长度有些大于在位静息肌小节的长度;(3)有些在位粗肌丝,其长度已被拉伸到约为静息肌小节长度的 3 倍,可是其两端仍附着在Z线上。此外,当肌小节长度已经超过按 Huxley 模型计算,两组肌丝早已不能重叠的长度后,在 ATP 作用下,间接飞翔肌肌原纤维仍能缩短(洪明霞、范世藩, 1963)。在高倍电子显微镜照片中,间接飞翔肌粗肌丝的横切面的中央部分染色较浅,边缘部分可以见到 6 个染色较深的点。在经负染的分离的粗肌丝电子显微镜照片中,可以看见在它上面有 2 或者 3 条纵行条纹。用脲或者胍处理,从粗肌丝可以分出直径约为 5 nm 的微丝。在微丝上有时可见间距约为 40 nm 的突起(陈明、范世藩,1965),根据这些实验结果,我们曾经提出蜜蜂间接飞翔肌肌原纤维粗肌丝的结构模型,它由一根贯穿整个肌小节,由Z线联结到Z线的内芯以及一层仅位于A带的、由 6 根微丝组成的外套所构成(范世藩、洪明霞等,1966)。近年来,人们发现许多无脊椎动物,甚至一些脊索动物横纹肌粗肌丝中除含有肌球蛋白外,还含有副肌球蛋白(邹永水、龚祖埙, 1978; Winkelman, 1976)。新近,我们证实蜜蜂间接飞翔肌肌原纤维也含有副肌球蛋白(范世藩、陈明,1981; 陈明、范世藩, 1982; 陈明、周念辉等, 1982; Fan 和 Chen 等, 1981)。本文将报告我们得到的关于副肌球蛋白在粗肌丝中的位置以及粗肌丝微丝构成的进一步资料。

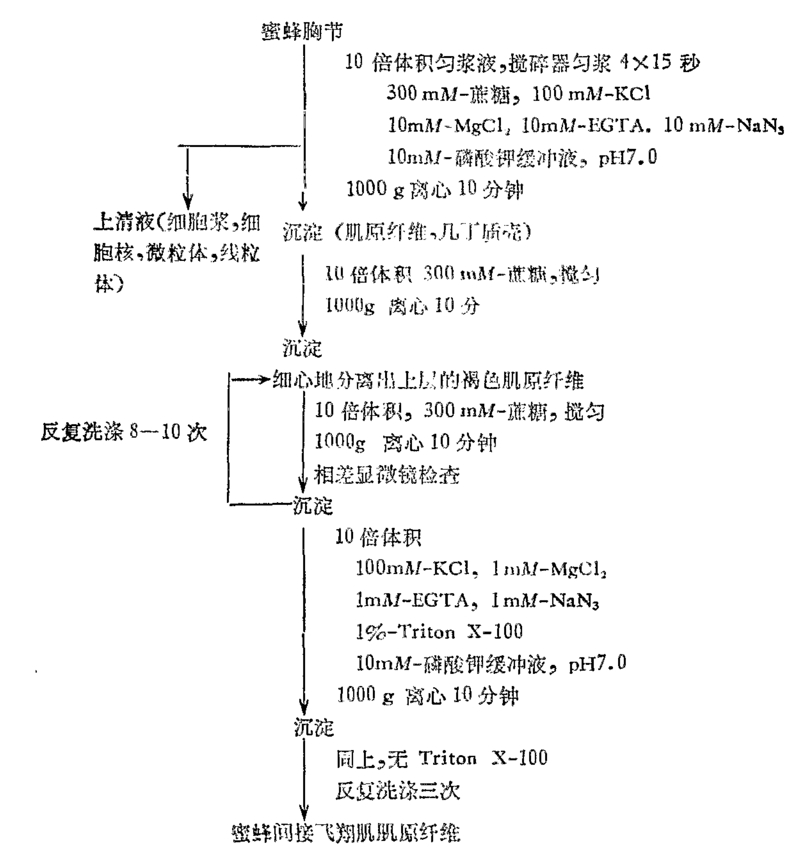
本文于 1984 年 5 月收到。
蜜蜂由上海市金山县亭新蜂场提供。宋秀娥同志协助进行电子显微镜观察,王宝华同志参加技术工作,谨致谢意。

材 料 和 方 法

1. 材料　本工作以蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spin. 间接飞翔肌为实验材料。

2. 肌原纤维的制备　将蜜蜂胸节纵剖后，浸入已预冷至 4℃ 的 50% 甘油（V/V）溶液中，在 4℃ 下放置过夜。次日，换同样的甘油溶液一次，移入 −20℃ 下保存。甘油溶液中含 100 m*M* KCl，1 m*M* $MgCl_2$，1 m*M* EGTA，1 m*M* NaN_3，10 m*M* 磷酸缓冲液，pH7.0。蜜蜂胸节肌肉经上述溶液处理一周以上后，以 15% 甘油（V/V）洗涤数次，然后按表 1 所列步骤分离肌原纤维。分离后的肌原纤维仍然保存在 −20℃ 下的 50% 甘油（V/V）溶液中。

表 1　蜜蜂间接飞翔肌肌原纤维的制备



3. 肌丝的分离　将经 50 m*M* Tris 醋酸缓冲液（pH 8.2）抽提过夜，或者未经上述溶液处理过的肌原纤维悬浮于 100 m*M* KCl，10 m*M* 焦磷酸钾，2 m*M* EGTA，5 m*M* $MgCl_2$，1 m*M* DTT，1 m*M* NaN_3，10 m*M* ATP，10 m*M* 磷酸缓冲液，pH 7.0 的溶液中，充分搅动，在 2℃ 下经 10,000g 离心 30 分钟。离心后的上清液含有已离散的粗、细肌丝，再经 DEAE 纤维处理，除去细肌丝，可以得到比较纯的粗肌丝制剂。

4. 电子显微镜观察。将粗肌丝悬浮液滴于火棉胶-碳膜的标本栅上，以 100 m*M* 醋酸铵溶液滴洗 3—4 次，再用 1.5% 醋酸铀负染，借日立 H-500 电子显微镜观察。

结果和讨论

副肌球蛋白易溶于中性或者微碱性的高离子强度的溶液，而在微酸性条件下，当离子强度 $\Gamma/2 \leqslant 0.3$ 时即以针状类晶体形式析出。我们利用肌球蛋白能溶解于 300 mM KCl，pH 6.0 的溶液中，而副肌球蛋白不能溶解的特性，以这种溶液处理分离的粗肌丝，以探索蜜蜂间接飞翔肌粗肌丝的内芯与外套的蛋白质组成。实验结果表明，在处理时间较短时，可以看到一些粗肌丝的端头散开成为多根微丝。微丝数最多为 7 根(图版 I:A)。延长处理时间，可以看到粗丝中央区域有部分物质逐渐被溶去，其直径减至 5 nm 左右(图版 I:B)。再延长处理时间，这段直径细的部分的长度增加。经 300 mM KCl，pH 6.0 的溶液处理 60 分钟以后，其长度可达 0.35 u (图版 I:C)。显示粗肌丝位于 A 带的外套是由肌球蛋白形成；而在粗肌丝中不能以微酸性的低离子强度盐溶液溶解的内芯则是由副肌球蛋白所构成。同时，这个结果也提示，肌球蛋白在和 300 mM KCl，pH 6.0 的溶液接触以后，溶解是从轻酶解肌球蛋白 (LMM) 端开始的。

上述结果指出，蜜蜂间接飞翔肌肌原纤维粗肌丝的结构确是像我们以前所提出的那样，由一根贯穿整个肌小节的内芯以及位于 A 带的、由 7 根微丝形成的外套构成。外套部分由肌球蛋白分子组成，内芯部分至少在中间一段是由副肌球蛋白分子组成。目前，我们正进一步设法用抗副肌球蛋白抗体标记经 300 mM KCl，pH 6.0 的溶液处理后的粗肌丝，探究其内芯的蛋白质性质。图 1 是蜜蜂间接飞翔肌粗肌丝的结构示意图。

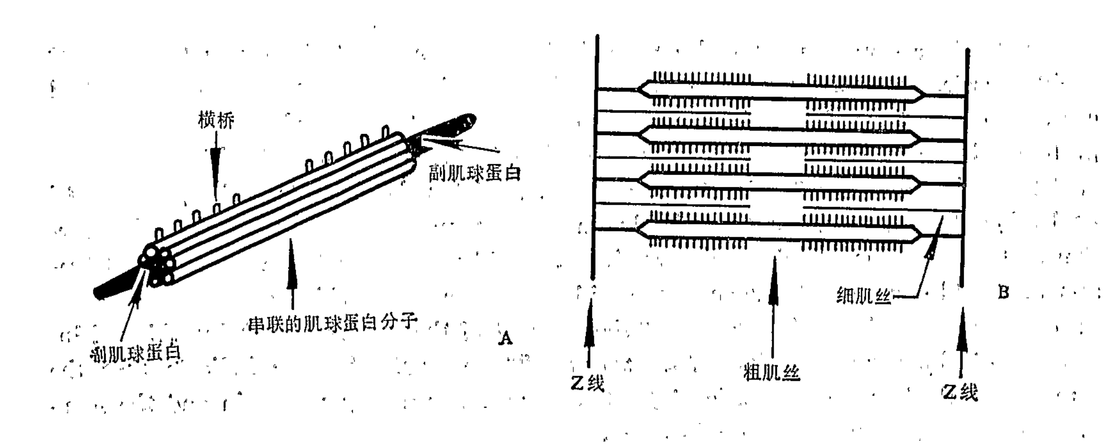


图 1　蜜蜂间接飞翔肌肌原纤维粗肌丝的结构示意图

A　单根粗肌丝的结构示意图。为观察清楚起见，只在一根肌球蛋白分子组成的微丝上画出横桥。
B　粗肌丝在肌原纤维中的结构示意图。

新近，Pepe (1982) 以及 Maw 和 Rowe (1980) 曾报告，从脊椎动物骨骼肌粗肌丝的端头可以散开成为 3 根微丝。这个结果和本文报告结果的差异，看来是蜜蜂间接飞翔肌粗肌丝的结构与脊椎动物骨骼肌粗肌丝的有不同的又一证据。

参　考　文　献

范世藩、洪明霞、陈明 1966a 蜜蜂飞翔肌肌原纤维蛋白细丝的排列和结构的电子显微镜观察。生理学报 29(1): 81—96。

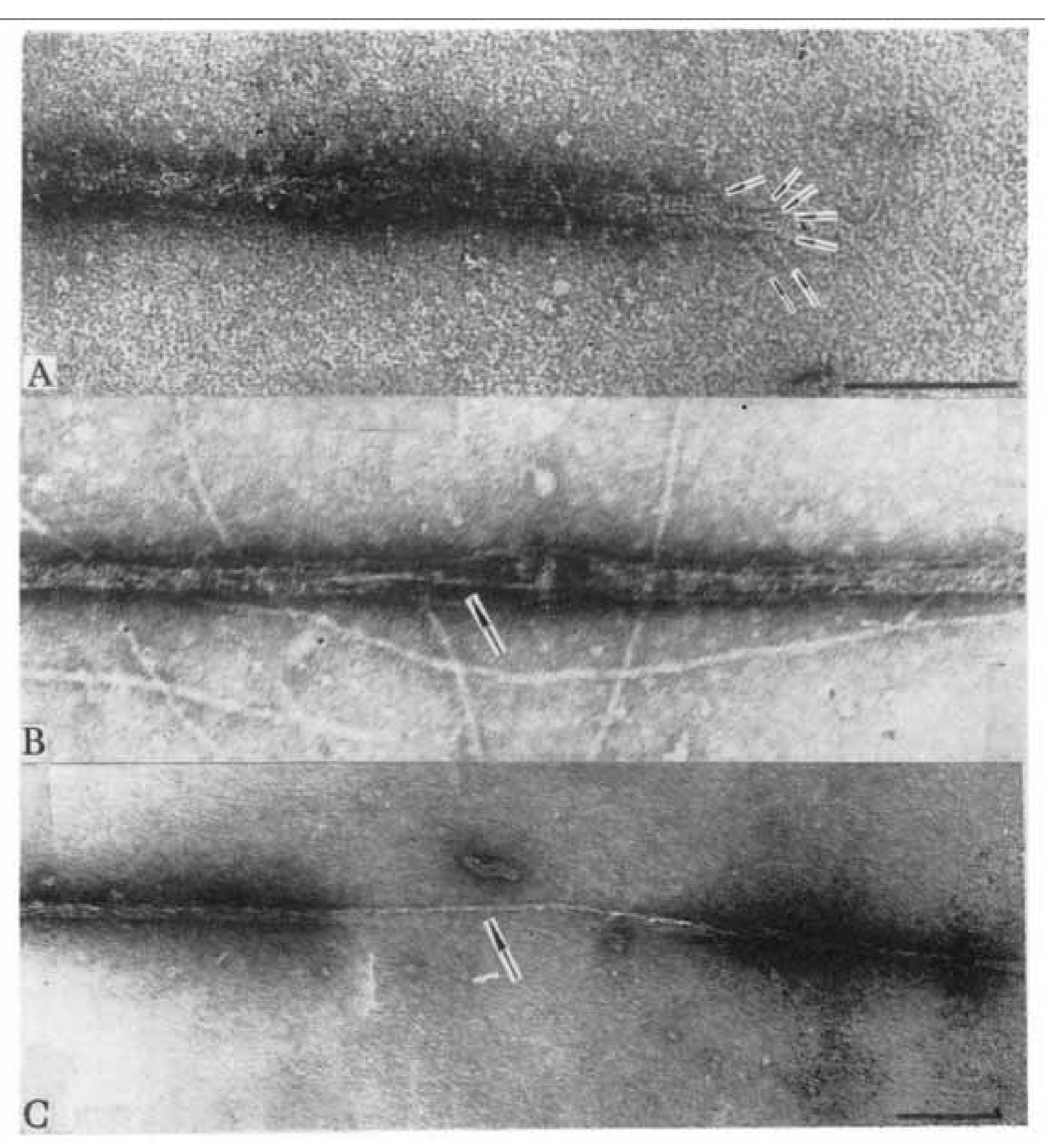
范世藩、洪明霞、陈明 1966 b 蜜蜂飞翔肌肌原纤维粗蛋白细丝的电子显微镜观察。科学通报 17(5): 219—22。
范世藩、陈明 1981 蜜蜂间接飞翔肌肌原纤维粗丝的结构。第四次中国生物化学学术会议论文摘要汇编，5—6 页。南宁。
陈明、范世藩 1965 从蜜蜂横纹肌肌原纤维粗蛋白细丝分离微丝的观察。生物化学与生物物理学报 5(6): 673—4。
陈明、范世藩 1982 蜜蜂间接飞翔肌肌原纤维副肌球蛋白的鉴定。生物化学与生物物理学报 14(1): 94—6。
陈明、周念辉、范世藩 1982 蜜蜂飞翔肌收缩蛋白的电子显微镜鉴定。昆虫学报 25(4): 465—8。
洪明霞、范世藩 1963 关于蜜蜂横纹肌肌原纤维能够收缩的最大肌小节长度。生理学报 26(1): 35—8。
邹永水、龚祖埙 1978 文昌鱼副肌球蛋白纤维及其细微结构。生物化学与生物物理学报 10(4): 375—80。
Maw, M. C. and Rowe, A. J. 1980 Fraying of A-filaments into three subfilaments. *Nature* 286(5771): 412—4.
Pepe, F. A. 1982 The structure of vertebrate skeletal-muscle myosin filaments. in Dowben, R. M. and Shay, J. W. (ed.) Cell and Muscle Motility. Vol. II, pp 141—71. Plenum Press, New York and London.
Fan S. F., Chen, M., Zhou, N. H., Sung, H. E. and Lu, W. Y. 1981 Site of paramyosin in honey bee flight muscle. *J. Gen. Physiol.* 78(6): 16a.
Winkelman, L. 1976 Comparative studies of paramyosin. *Comp. Biochem. Physiol.* 55B(3): 391—7.

THE SUBFILAMENT STRUCTURE OF THE THICK MYOFILAMENT OF THE HONEY BEE INDIRECT FLIGHT MUSCLE

FAN SHI-FAN CHEN MING
(Shanghai Institute of Physiology, Academia Sinica)

In 1966 we proposed a model for the thick myofilament of the honey bee indirect flight muscle. It was suggested that the thick myofilament was composed of a central core, extending from Z to Z line and a mantle, composed of probably six rod-shaped protein subfilaments. In this article, we provide further experimental evidences for this model. Eight minutes after treating the isolated thick myofilaments with 300 m*M* KCl (pH 6.0) solution, which can only dissolve myosin but not paramyosin, the terminal portion of the myofilament might separate into 7 subfilaments. Prolonging the time of treatment would cause the diameter of the middle portion of the thick myofilament to reduce to only about 5 nm. The length of the segment of the myofilament being thinned increased with increasing the time of treatment. These results further indicate that the core of the thick myofilament is at least partly composed of paramyosin and the mantal is composed of six myosin subfilaments.

Key words honey bee——indirect flight muscle——thick myofilament——subfilament——myosis——paramyosin



经 300 m*M* KCl，pH 6.0 的溶液处理后的蜜蜂间接飞翔肌粗肌丝（横线代表 0.1 μ）

A　处理 8 分钟后，注意粗肌丝一端分散成为 7 根微丝（箭头所指），×240,000。

B　处理 18 分钟后，在粗肌丝中央剩下一段直径仅约为 5 nm 的微丝（箭头标记处），×144,000。

C　处理 60 分钟后，在粗肌丝中央剩下的直径约为 5 nm 的微丝（箭头标记处）的长度已增至 0.35μ，×144,000。